

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-507203

(43) 公表日 平成8年(1996)8月6日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 9/00		9359-4B	
A 6 1 K 31/70	ADY	9454-4C	
C 0 7 H 21/02		8615-4C	
21/04	B	8615-4C	
		9162-4B	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-514284
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)12月3日
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)6月5日
 (86) 国際出願番号 PCT/US 93/11783
 (87) 国際公開番号 WO 94/13791
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)6月23日
 (31) 優先権主張番号 987, 465
 (32) 優先日 1992年12月4日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, JP

(71) 出願人 イノーバー ラボラトリーズ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021, ニューヨーク, イースト 73アールディー ストリート 510
 (72) 発明者 ジョージ, シャー ジー ティー.
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021, ニューヨーク, イースト 70ティージェイ ストリート 220
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 調節可能な核酸治療およびそれらの使用方法

(57) 【要約】

調節可能なリボザイムの構築が述べられている。ここでは、リボザイム配列はリガンド結合配列に連結されており、リボザイム活性をリガンドの制御下に置き、活性化または不活性化のためにリガンドの存在を必要とする。ここでは、一部分がリガンドと結合し得、そして他の部分がリボザイムであるRNA分子が構築される。リガンドに結合する分子を選択した後、2回目の選択プロセスを行い、ここで、リガンド結合分子がリガンドまたは「共薬剤」の存在下または非存在下におけるその触媒機能についてアッセイされる。このようにして、調節可能なリボザイムは、リガンドの存在下での標的RNAの切断、またはリガンドの非存在下での標的RNAの切断に用いるために選択される。この方法および調節可能なリボザイムは、制御された様式で標的RNA分子を切断するために有用である。標的RNA分子が細胞中に存在し、これらのRNA分子の完全な不活性化によって宿主細胞が殺されることが望ましくない場合に、それは特に有用である。

【特許請求の範囲】

1. 別個の標的されるRNA分子を切断するリボザイム配列および合成されそしてリガンドへの結合能力について選択されるRNA配列を含む調節可能なリボザイム分子であって、ここで該リガンドの結合が、該標的されるRNAに対する該リボザイムの活性を変化させる、リボザイム分子。
2. 前記リガンドが、核酸分子、タンパク質、多糖、糖、および有機分子および無機分子からなる群から選択される、請求項1に記載のリボザイム分子。
3. 前記リボザイムが、ハンマーヘッドリボザイム、アクセヘッドリボザイム、イモリサテライトリボザイム、テトラヒメナリボザイム、およびRNAアーゼPからなる群から選択されるリボザイム由来である、請求項1に記載のリボザイム分子。
4. 前記リボザイムが、RNAアーゼPをさらに含むRNAアーゼPに対する外部ガイド配列である、請求項1に記載のリボザイム分子。
5. 前記リボザイムが、前記リガンドが前記分子に結合するときに不活性化される、請求項1に記載のリボザイム分子。
6. 前記リボザイムが、前記リガンドが前記分子に結合するときに活性化される、請求項1に記載のリボザイム分子。
7. リガンドが、細胞中に見出される産物であり、そして前記リボザイム活性が、該細胞中で該リガンドに結合することにより変化する、請求項2に記載のリボザイム分子。
8. 前記リガンドが、前記調節可能なリボザイム分子を含む細胞に外因的に投与される共薬剤である、請求項1に記載のリボザイム分子。
9. 遺伝子との組み合わせにおいて調節可能なリボザイムをコードする核酸分子であって、ここで、該調節可能なリボザイムが、別個の標的されるRNA分子を切断するリボザイム配列および合成されそしてリガンドへの結合能力について選択されるRNA配列を含み、ここで、該リガンドの結合が、該標的されるRNAに対する該リボザイムの活性を変化させる、核酸分子。
10. 前記遺伝子に隣接する核酸配列をさらに含み、ここで該配列が、リボザ

イムの基質である、請求項9に記載の分子。

11. 前記配列が、前記遺伝子の5'および3'側にある、請求項10に記載の分子。

12. プロモーターおよびマルチクローニング部位をさらに含む、請求項9に記載の分子。

13. 前記遺伝子の前記産物が、前記リボザイムの前記活性を調節する、請求項9に記載の分子。

14. 調節可能なリボザイム分子の作製方法であって、該リボザイム分子が、別個の標的RNA分子を切断するリボザイム配列および合成されそしてリガンドへの結合能力について選択されるRNA配列を含み、ここで、該リガンドの結合が、該リボザイムの活性を変化させる方法であって、以下の工程：

標的されるRNA分子を切断するリボザイム活性を有する配列に結合される、20～100ヌクレオチドのランダムヌクレオチド配列を提供する工程；

該ランダム配列の変異を促進するの条件下で、該ランダム配列を増幅する工程；

該リボザイムの触媒活性を改変するために用いられるリガンドに、該リボザイムが該リガンドに結合するために好ましい条件下で、変異配列を曝す工程；

該リガンドに結合しない変異配列を除去する工程；

該リガンドに結合する変異配列が得られるまで、増幅およ

び結合の工程を繰り返す工程；

リボザイムリガンド結合分子を、リガンドに曝す工程；および

リガンド結合配列に、リガンドが結合するとき、およびリガンドが結合しないときに、リボザイム活性の変化についてスクリーニングする工程；
を包含する、方法。

15. 標的RNA分子のリボザイム仲介切断を変化させる方法であって、該標的RNA分子が切断される部位に調節可能なリボザイム分子を提供する工程を包含し、該リボザイム分子が、別個の標的されるRNA分子を切断するリボザイム配列およ

び合成されそしてリガンドへの結合能力について選択されるRNA配列を含み、ここで、該リガンドへの結合が、該標的されるRNAに対する該リボザイムの活性を変化させることを包含する、方法。

16. 前記リガンドが、核酸分子、タンパク質、多糖、糖、および有機分子および無機分子からなる群から選択される、請求項15に記載の方法。

17. 前記リボザイムが、ハンマーヘッドリボザイム、アクスヘッドリボザイム、イモリサテライトリボザイム、テトラヒメナリボザイム、およびRNAアーゼPからなる群から選択

されるリボザイム由来である、請求項15に記載の方法。

18. 前記リボザイムが、RNAアーゼPをさらに含む、RNAアーゼPに対する外部ガイド配列である、請求項15に記載の方法。

19. 前記リボザイムが、前記リガンドが前記分子に結合するときに不活性化される、請求項15に記載の方法。

20. 前記リボザイムが、前記リガンドが前記分子に結合するときに活性化される、請求項15に記載の方法。

21. リガンドが、細胞中に見出される産物であり、そして前記リボザイム活性が該細胞中で該リガンドに結合することにより変化する、請求項15に記載の方法。

22. リガンドが、ウイルスに感染した細胞中に見出される産物であり、そして前記リボザイムが、該リガンドに結合することにより活性化される、請求項15に記載の方法。

23. 請求項15に記載の方法であって、前記調節可能なリボザイム分子が、以下の工程：

標的されるRNA分子を切断するリボザイム活性を有する配列に結合される、長さが20と100との間のヌクレオチドであるラ

ンダムヌクレオチド配列を提供する工程；

該ランダム配列の変異を促進する条件下で、該ランダム配列を増幅する工程；

該リボザイムの触媒活性を改変するために用いられるリガンドに、該リボザイムが該リガンドに結合するために好ましい条件下で、変異配列を曝す工程；

該リガンドに結合しない変異配列を除去する工程；

該リガンドに結合する変異配列が得られるまで、増幅および結合の工程を繰り返す工程；

リボザイムリガンド結合配列を、該リガンドに曝す工程；および

該リガンド結合配列に、リガンドが結合するとき、およびリガンドが結合しないときに、リボザイム活性の変化についてスクリーニングする工程；
により作製される、方法。

24. 調節可能なRNA分子を作成する方法であって、該RNA分子が、生物学的機能を有する第1 RNA配列および合成されそして変異されたリガンド結合第2 RNA配列を含み、ここで、該リガンドの該変異第2 RNA配列への結合が該第1 RNA配列の生物学的活性を変化させる方法であって、

以下の工程：

生物学的機能を有する該第1 RNA配列に結合されるランダムヌクレオチド配列を提供する工程；

該ランダム配列の変異を促進する条件下で、該ランダムヌクレオチド配列を増幅する工程；

該第1 RNA配列の該生物学的機能を変化させるために用いられるリガンドに、該変異第2 RNA配列が該リガンドに結合するために好ましい条件下で、変異ランダム配列を曝す工程；

該リガンドに結合しない変異ランダムヌクレオチド配列を除去する工程；

該リガンドに結合する該変異第2 RNA配列が得られるまで、増幅および結合の工程を繰り返す工程；

該RNA分子を、リガンドに曝す工程；および

該リガンド結合変異第2 RNA配列に、リガンドが結合するとき、およびリガンドが結合しないときに、該第1 RNA配列の生物学的活性の変化についてスクリーニングする工程；

を包含する、方法。

25. 前記第1 RNA配列が、細胞中で発現されるmRNA配列である、請求項24に記載の方法。

26. RNA分子であって、該分子が、生物学的機能を有する第1 RNA配列および合成されそしてリガンドに結合するように選択される第2 RNA配列を含む分子であって、ここで、該リガンド結合第2 RNA配列への該リガンドの結合が、該第1 RNA配列の該生物学的機能を不活性化または活性化する、RNA分子。

27. 前記第1 RNA配列が、細胞中で発現されるmRNA配列である、請求項24に記載のRNA分子。

【発明の詳細な説明】

調節可能な核酸治療およびそれらの使用方法

発明の背景

本発明は、調節可能なリボザイムを用いてRNAを切断する方法および組成物に関する。

リボザイムを、酵素様活性を有するRNA分子であると定義する。RNA触媒による切断の一般的な3経路がある：ウイロイド様RNAによる切断、Yale UniversityのSidney Altmanの研究であるRNAアーゼPまたはRNAアーゼPのRNA成分による切断、University of ColoradoのThomas Cechの研究であるテトラヒメナリボザイムによる切断。現在までに知られている全ての天然に生じるリボザイム（ただし、RNAアーゼPを除く）はシスで作用し、そしてトランス、すなわち別の分子上で作用するように設計されなければならない。このことは、酵素活性を有するRNA分子部分を、基質として扱われる部分から分離すること、および切断すべき標的分子に適切な配列および適切な二次および三次構造を含む基質様性質を付与することにより達成される。標的分子に切断すべき部位の近くにハイブリダイズする相補的核酸配列を加えることにより、特異性が付与され得る。

リボザイムのそれぞれのクラスは、別々の作用機構を用いてヌクレオチドの異なる配列を切断する。その上、それぞれのクラスは、酵素活性のためにどれだけのヌクレオチド塩基

が必要であるかに基づいて区別され、そしてある程度までは、意図される標的およびリボザイムは特異性を変えるように操作され得る。

M1 RNA、つまりE. coli RNAアーゼPのRNAリボザイムサブユニットは、400塩基近いRNA分子であり、それは、前駆体トランスファーRNAを切断して成熟tRNAを生成する。他の分子は、M1 RNAまたはRNAアーゼPの基質に変換され得る。この変換は、切断されるべきRNA中の3'から切断部位までのヌクレオチドと相補的な少なくとも7ヌクレオチドを5'末端に有し、3'末端で、ヌクレオチドNCC Aが相補的なヌクレオチドに直接結合する単離されたオリゴリボヌクレオチドとして特徴付けされる外部ガイド配列を用いて行われる。ここで、Fosterおよび

Altmanら、Science 249 : 783-786 (1990) , "External Guide Sequences for an RNA Enzyme". に記載のように、Nは任意のヌクレオチドであり、そして、切断されるべきRNA中の相補的なヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチド中の相補的なヌクレオチドである。Yuan, Hwang, およびAltman, Proc. Natl. Acad. Sci. 89 (17) : 8006-8010 (1992) , "Targeted Cleavage of Messenger RNA by Human RNase P"は、近年、前駆体tRNA由来の構造に基づくE. coli RNAアーゼPの真核等価物についての外部ガイド配列の構築を記載した。

植物および動物から、数種のウイロイド様RNAリボザイムが見出されている。植物ウイロイド様リボザイムは、20ヌクレ

オチドぐらいに小さく設計され得る。中心となるモチーフは、UhlenbeckがNature 328 : 596-600 (1987) に記載した特有の保存された配列であり、この文献で彼は全てのハンマーヘッドが特定の特徴を共有することを提唱した。ウイロイド様リボザイムのメカニズムは、2'、3' 環状リン酸エステルおよび5' ヒドロキシル末端を生成する。

これらの触媒RNAを近年発見したことにより、RNAに基づく病原の疾患（すなわち、外因性の原因（例えば、ウイルスまたは細菌）または内因性の原因（例えば、新規なRNAの発現または既に存在するRNAの過露出發現）による、新しいRNAの存在から生じる疾患）を治療する新規な研究法のためのメカニズムを提供する。アンチセンス技術を超えるリボザイムの理論上の利点は、例えば、それらの触媒作用にある。標的病原性RNAは、特定のリボザイムにより切断される。RNAの生物学的活性を不可逆的に不活性化すると、その後「逆転」が生じ、切断産物からのリボザイムが解離し、別の標的RNA分子と結合する。

しかし、リボザイムのこの利点が、環境条件において不利となることが判明し得る。例えば、病変が細胞遺伝子の過発現から生じる場合、疾患の治療について所望されるのは、メッセージの適切なレベルまでの減少であって、特定の細胞のメッセージの除去または死ではない。このような過発現は、癌腫形成の1つのメカニズムであり、細胞生長に関わる正常な細胞遺伝子が、他の染色体からの正常な形態のバックグラウンド中で、改変形態の過発現または発現を通して脱調節さ

れる。このような場合、疾患を有する細胞中で標的RNAの特定集団のみを不活性化したいため、メッセージのレベルを健常な細胞中で以前に存在していた安定状態のレベルに戻す。リボザイムのような治療は、慎重なおよび長時間調整可能な様式で、治療の環境的応答コントロールを可能とする。このリボザイムは、その活性、すなわち、標的RNAを不活性化させる速度が、最終産物のフィードバックによる阻害または外的な投与または無害な「共薬剤」の投与中止により調節され得る。

近年の研究により、RNA分子が、他のRNA分子の切断に加えて行い得る触媒機能の驚くべき多様性が示された。RobertsonおよびJoyce, Nature 344 : 467, 1990 ; EllingtonおよびSzostak, Nature 346 : 818, 1990 ; Piccirilliら、Science 256 : 1420, 1992 ; Nollerら、Science 256 : 1416, 1992 ; EllingtonおよびSzostak, Nature 355 : 850, 1992 ; Bockら、Nature 355 : 564, 1992 ; BeaudryおよびJoyce, Science 257 : 635, 1992 ; oliphentら、Mol. Cell. Biol. 9 : 2944, 1989 ; これらの教示は、本明細書中に明確に援用されている。触媒またはリガンド結合という機能を与えられたRNA分子を、「インビトロでの遺伝的形質 (in vitro genetics)」と呼ばれる (Szostak, TIBS 19 : 89, 1992) 中のランダム分子の複合混合物から選択し得る。ランダムで規定された配列を有する大きなプールのRNA分子を合成し、そして複合混合物 (例えば、100 μ gの100ヌクレオチドRNA中の約 10^{15} の個々の配列) を、ある種の選択および富化工程にかける。例えば、カラム上でリガ

ンドに結合する分子に、アフィニティクロマトグラフィーおよびPCR増幅のサイクルを繰り返し行うことにより、EllingtonおよびSzostak (1990) は、 10^{10} 個のRNA分子のうち1個が、与えられたリガンドに結合するように折り畳みを有することを評価した。このようなリガンド結合作用を有するDNA分子が単離されている (EllingtonおよびSzostak, 1992 ; Bockら、1992) 。触媒DNA分子もまた見出され得る。

従って、本発明の目的は、リボザイムを提供することである。このリボザイムの触媒活性は、リボザイムに結合しそして標的核酸への結合または標的核酸の切

断に影響を与えるリガンドの存在により、調節または制御し得る。

さらなる目的は、調節可能なリボザイムを用いる方法を提供することである。

発明の要旨

調節可能なリボザイムの構築を記載している。ここで、リボザイム配列はリガンド結合配列に連結され、リボザイムの活性はリガンドの制御下におかれ、活性化または不活性化するためには、リガンドが存在することが必要である。一部分がリガンドに結合し得、そして他の部分がリボザイムであるRNA分子が構築される。リガンドに結合する分子を選択した後、2回目の選択プロセスを行う。ここでは、リガンド結合分子が、リガンドまたは「共薬剤」の存在下および非存在下におけるその触媒機能についてアッセイされる。このようにして、

調節可能なリボザイムは、リガンド存在下での標的RNAの切断、またはリガンド非存在下での標的RNAの切断に用いるために選択される。

この方法および調節可能なリボザイムは、制御された様式において、標的RNA分子を切断するのに有用である。標的RNA分子が細胞中に存在し、これらのRNA分子の完全な不活性化により、宿主細胞が殺されることが望ましくない場合に、特に有用である。

図面の簡単な説明

図1 A、1 B、1 C、および1 Dは、調節可能な核酸療法の模式図である。図1 Aは、調節可能なリボザイム成分および幾つかの可能な立体配座の模式図である。図1 Bは、特定のリガンドに結合する調節可能なリボザイムの単離方法の模式図である。図1 Cは、リガンドに結合したときに触媒活性である調節可能なリボザイムの模式図である。図1 Dは、リガンドの存在下で触媒不活性である調節可能なリボザイムの模式図である。

図2は、リガンドに結合していないときに不活性である、調節可能なリボザイムを用いる細胞中での標的されたRNAの切断工程の模式図である。図2 Aは、標的RNAにコードされるタンパク質が、RNAを切断するリボザイムの活性をポジティブに調節する系である。図2 Bは、リボザイムに結合する共薬剤もまた存在する場合にのみ、リボザイムが標的RNAに対して活

性である系である。

図3Aは、調節可能なリボザイムの配列(138ヌクレオチド)を示す。この配列は、B型肝炎ウイルス(HBV)表面抗原(HBsAg)mRNA(配列番号:1)に対するハンマーヘッドリボザイム(39nt)の配列の近隣のチバクロンブルー(CB)染料結合配列(99nt)を含むDNAオリゴヌクレオチドを合成することにより構築した。図3Bは、1×TBE中で800ボルトで行った4%ポリアクリルアミド電気泳動ゲルを示し、これは、CBの非存在下および存在下で、HBsAgメッセージの切断における活性についてのリボザイムの試験に用いた。リボザイムに対する基質(HBsAg mRNAのプレーS2/S領域に対応する837ヌクレオチドRNA)の比は、1:4であった。レーン1~3、4~6、7~9、および10~12は、それぞれ0.5、1、2.5、および4時間のリボザイムと基質との反応時間を表す。レーン1、4、7、および10は、リボザイム、基質、およびEDTAを含むコントロール反応である。レーン2、5、8、および11は、 Mg^{2+} の存在下でのリボザイムと基質との反応であり、時間の経過につれて切断が増加したことを表す。レーン3、6、9、および12は、 Mg^{2+} およびチバクロンブルーの存在下でのリボザイムと基質との反応であり、リガンドはリボザイム配列に結合されていた。

図4Aは、共薬剤の存在下においてのみHBsAgを切断する、共薬剤活性化リボザイムの使用を示す模式図である。

図4Bは、以下のような発現ベクターの構築を示す模式図である。ここで、ある配列に対する調節可能なリボザイムの

遺伝子は、マルチクローニング部位中にクローニングされるいずれの遺伝子の発現をも制御する同一のプロモーターと一緒に構成性プロモーターの制御下におかれる。次にリボザイム活性制御配列、次にマルチクローニング部位、次に、再びリボザイム活性制御配列、次にマルチクローニング部位、次に再びリボザイム活性制御配列、次にポリアダニール化シグナルと続く。

図4Cは、図4Bのリボザイムの自己調節発現系の構築物が、遺伝子産物により調節されることを示す模式図である。

図4Dは、共薬剤の非存在下で、調節可能なリボザイムリーダー配列は、翻訳

されるmRNA能力を妨げ、そしてリーダー配列への共薬剤の結合下では、この阻害を減じ、そして翻訳を行い得ることを示す模式図である。

発明の詳細な説明

リガンドの存在下または非存在下で調節され得るリボザイムを用いて、標的されるRNA分子の制御性切断のための方法および組成物が記載されている。1つの場合には、リボザイムはリガンドの存在下で活性であり、他の場合には、リボザイムはリガンドの存在下で不活性である。

標的RNAが、細胞の生存性に不可欠であり、RNAの発現レベルの完全な不活性化または除去よりは、減少のみが所望される場合に、この方法は有用である。例えば、癌腫形成の1つの提唱されたメカニズムは、生長および増殖という細胞周期

の調節に関係するような細胞遺伝子の過発現である。腫瘍細胞へのみにリボザイムを特異的に送達し得ずに、腫瘍が生じた細胞から正常な細胞までに送達し得る。目標は、腫瘍細胞を再調節することであって、正常細胞ではない。例えば、リボザイムが、細胞の遺伝子の過発現タンパク質産物の存在下でのみ調節可能で活性である場合、相当するRNAの効率的な切断は、このタンパク質の濃度が、全リボザイム分子に全てが結合するために十分なレベルにある場合にのみ起こる。RNAのレベルはリボザイム切断によって低下するので、タンパク質レベルは低下し、タンパク質が結合しない、従って不活性立体配座である幾分かの量のリボザイム分子が得られる。結局、リボザイム不活性化とRNA合成との間で、何らかの平衡が得られる。あるいは、リボザイムの送達が非特異的である場合、「共薬剤」の投与により、リボザイムを活性化し得る。ここで、「共薬剤」は、このような細胞中でより高濃度が得られる腫瘍細胞のような急速に増殖する細胞により優先的に取り上げられ得る。リボザイムは、不可欠な細胞遺伝子に対して標的され得、そしてこの共薬剤の存在下のみで活性であり得る。腫瘍量が充分減少または除去された場合、共薬剤の投与は中止され、そして正常細胞に存在するどんなリボザイムも不活性になる。

別の例は、B型肝炎感染に関連する肝細胞癌における状況である。証拠は、肝細胞の宿主細胞DNA中に組み込まれているウイルスゲノムが、細胞の腫瘍細胞へ

の変換のための引き金

となることを示唆している。このことは、ウイルス遺伝子、表面抗原、またはトランス活性化因子hbxの発現、またはそれ自体の組み込みの結果によりなされ得る。後者の場合、表面抗原またはhbxのリボザイム切断によるウイルス遺伝子の発現の不活性化は、なんら効果がない。所望されるものは、細胞が死ぬために細胞の生存に不可欠なRNAのリボザイム切断である。しかし、送達プロセスはしばしば非特異性であるので、リボザイムは、殺されるべきであるウイルスを保有していない細胞にも送達され得る。リボザイムが表面抗原タンパク質またはhbxタンパク質の存在下でのみ活性である場合、これらのウイルスを有する細胞のみが殺される。

逆に、調節可能なリボザイム系は、リボザイムがリガンドの非存在下でのみ活性であるようにも考え出され得る。適切な細胞の機能付けにおいて重要な細胞産物を遮断するように作用する、リプレッサータンパク質の不適切な発現の結果として、細胞が異常である場合、調節可能な遺伝子治療の形態を設計し得る。リプレッサー自体において、リプレッサーのmRNAの非制限的なリボザイム切断は、異常な細胞作用をもたらす。しかし、リボザイムが抑制遺伝子のタンパク質産物により調節される場合、すなわち、その存在下で不活性である場合、系は自己調節になる。そのmRNAをリボザイムが切断することによりリプレッサータンパク質のレベルが下がるので、抑制遺伝子は脱抑制され、そしてそのタンパク質が発現される。このタンパク質の濃度がある閾値に達するとき、リボザ

イム分子は、全てリガンドに結合し不活性化される。

調節可能なリボザイムの構築方法

調節され得るリボザイムは、以下に記載の方法により調製され単離され得る。適切なオリゴヌクレオチドがApplied Biosystems Incorporated (ABI, 850 Lincoln Center Dr., Foster City, CA 94404) 392型シンセサイザーで同社の試薬を用いて合成される。一般的な設計基準は図面を参照して以下で説明される。これらは、すべてリボザイムの機能を変えないような改変および変形が可能である。

図1 Aに示すように、ランダム配列12および与えられた標的RNA（示さない）に対する規定のリボザイム配列14を含む合成された核酸分子10は、異なる立体配座10a、10bの複合混合物を形成する。リボザイム配列14は規定されているが、リボザイム部分14を含む全体分子10の立体配座は、ランダム配列12とそれ自体およびリボザイム配列14との相互作用により決定される。

結合するのに十分な複雑性を有する小さい有機分子、またはタンパク質のような巨大分子のような所望のリガンド20に結合する立体配座に折り畳まれるこれらの分子10を選択するために、RNA分子10a、10bなどの複合混合物を、BendryおよびJoyce, 1992により記載されたように、リガンド結合分子を富化させるために、アフィニティクロマトグラフィーおよびPCR増幅のラウンドを繰り返し行った。図1 Bに示したように、

これは、不活性基材上にリガンドを固定する工程、分子10の変異誘発を促進する条件下で、リガンドに結合し得る分子10を、PCRまたは等価な方法論を用いて増幅する工程、分子10とリガンド20との間であらゆる可能な結合が生じ得る条件下で、増幅した混合物を固定化リガンドに曝す工程、結合しない材料を除去する工程、および増幅プロセスを繰り返す工程により達成される。このようなサイクルを幾らか行った後、ほぼ全ての分子がリガンドに結合し得るRNA集団が生じる。

変異は、固定した出現頻度でのランダム置換を含む、変異原性オリゴデオキシヌクレオチドのセットを用いることにより、導入され得る。これらの部分的にランダム化されたオリゴヌクレオチドは、わずかなパーセントの不適切なモノマーを有すると予想されるヌクレオチド3'-ホスホルアミダイト溶液を用いて、自動化DNAシンセサイザー上で生成される。変異原性条件下で、PCRを行うことにより選択的増幅を各ラウンド行った後、さらに変異を導入した。選択的増幅により得られたRNAは、逆転写され、得られたcDNAは、PCR増幅され、そしてPCR産物は変異RNAが分配された子孫を作製するために転写される。

図1 Cに示すように、ある数の分子10が、リボザイム部分14を不活性化するように折り畳まれるべきである。これは、1つの場合には、分子のリボザイム部分の結合手14a、14bが標的RNA24に結合する能力を立体的に（steric）妨害する結

果であり、そして別の場合には、切断を阻害するリボザイムの

触媒中心14cの立体配座が変えられることにより生ずる。分子10のリボザイム活性のこの阻害または不活性化は、共薬剤（またはリガンド）20の次の結合により軽減される。

あるいは、図1Dに示すように、ある数の分子30が、リガンド20の存在下においてのみ、不活性立体配座に折り畳まれ、そしてその非存在下では、触媒活性立体配座31に折り畳まれる。

次いで、リガンド結合RNA集団は、共薬剤リガンドによりリボザイムの活性化または不活性化についてスクリーニングされる。選択は、少なくとも2つの方法において行われる。第1の場合、リガンド結合RNA分子の純集団を、逆転写酵素を介して2本鎖DNAに変換し、次いで、インビトロ発現ベクター中にクローニングする。クローニングされた配列を有する個々の細菌の形質転換体を生育し、組換えプラスミドを精製し、そしてリガンド結合／リボザイムRNAをコードする遺伝子を転写した。各クローンからの均一なRNAは、リガンドの存在下または非存在下で切断についてアッセイされる。

このプロセスを、単離され、転写され、そしてアッセイされなければならないクローンの全数を減少させるために、例えば、リガンド結合分子の複合プールの限界希釈を行うことにより、簡易化した。RNAの濃度および分子の既知の大きさから、単位体積当たりの分子数、すなわち、RNA溶液のモル濃度を容易に決定し得る。RNAの希釈は、統計学的に好ましい値、例えば、アッセイウェル当たり10⁵ RNA分子で行われ得る。100

マイクロタイタープレート（96ウェル）において、約10⁵分子が切断についてアッセイされ得る。EllingtonおよびSzostak（1990）は、10¹⁵の異なる配列の原集団中に、与えられたリガンドに結合するように折り畳まれている10¹⁰個のRNA分子あたり1個が存在し、そして最終的な調製物中に10²～10³の異なる配列があると評価した。リガンド結合について精製した後、分子のほぼ100%がリガンドに結合する。10⁵の異なるリガンド結合分子からのたった1つの分子のみが、リガ

ンドの存在により、活性化または不活性化されるリボザイムを有するとしたら、この方法は、その分子の単離を可能とする。リガンド結合RNAは、 10^{10} 倍のオーダーで、アフィニティクロマトグラフィーのサイクル中でのPCRにより富化されたので、かなり低いパーセントで存在するリガンド-調節リボザイムであっても、過度の実験をすることなしに単離され得る。共リガンドの存在下または非存在下で切断を生じるこれらのウェルは、PCR増幅され、クローニングされ、そして個々のクローンの転写物は、リガンドによる不活性化または活性化についてアッセイされる。

上記の方法論は、病原分子、またはタンパク質のような核酸以外の巨大分子の検出を可能にするために改変され得る。リボザイムは、タンパク質のような非核酸リガンドに結合すること、そして結合される場合、リガンドを有するリボザイムの全配列からリボザイムが活性である立体配座に置かれることの両方について選択された配列に連結される。

リボザイムは、特異的な標的されるRNA分子を切断するように設計される。ハンマーヘッドおよびアクセヘッド (HDV) リボザイムおよびテトラヒメナリボザイムからRNAアーゼPまでの範囲で、種々のリボザイムが利用され得る。RNAアーゼPは、全ての原核細胞および真核細胞にとって内因性であり、そして外部ガイド配列を用いて標的されるRNA分子を切断することを指示し得る。本明細書中に用いたように、調節可能なリボザイムのリボザイム成分は、RNAアーゼP（または、RNAアーゼPの原核RNA成分のM1 RNA）を含む系において、リボザイムまたは外部ガイド系 (EGS) を意味するために用いられる。ここでは、RNAアーゼPは、EGSにまたは溶液中で別々に結合され得る。標的される配列の切断は、リボザイムの選択に依存する。切断される配列は、リボザイムの選択に依存する。例えば、リボザイムがイモリサテライトRNAに由来する場合、切断部位はNXXIに従う：ここでNはいずれのヌクレオチドでもよく、XはG以外のいずれかのヌクレオチドであり、そしてUはウリジンである。

ランダム配列

ランダムRNA-リボザイム分子と標的RNAとの間で、ハイブリダイゼーションま

たはリガンドへの結合または塩基対の長さについて、塩基対のセット数は存在しない。なぜなら、これらは、各々のリボザイム系および標的されるRNAで変化するからである。しかし、一般的に、ランダム配列は、特異的なリ

ガンドへの結合について上記のように選択された、20と100との間のヌクレオチドを含む。本明細書中では「ランダム」配列と呼んでいるが、この配列は、選択プロセスにもともと用いられたもののみランダムなだけであり、選択プロセスの産物はランダムではなく、規定のリガンドに特異的に結合する特定の配列のセットであるということが理解される。

リガンドの選択

リガンドは、核酸分子、タンパク質、多糖または糖、または有機分子または無機分子であり得る。リガンドの性質は、外的に供給され得るように選択され得、例えば少なくとも標的されるRNAを含有する細胞に容易に入るいくつかの非毒性の分子または薬剤であり得、あるいは、制御リガンドが、直されるべき病因に直接または間接的に関係する標的細胞内のいくつかの小代謝産物または巨大分子であるように、内生系全体が設計され得る。例えば、標的RNAによりコードされるタンパク質は、リガンドになり得る。調節可能なリボザイムの活性は、病原性タンパク質への結合に依存する。標的RNAのレベルが、リガンド活性化リボザイムによる切断により低下するので、タンパク質リガンドの濃度は低下する。その濃度が、調節可能なRNA分子が全て占められている濃度より下に低下するとき、リボザイム切断の速度は低下し始める。異なるリボザイム-リガンド親和性について選択することにより、標的RNAのリボザイム仲介破壊の調節の適切なレベルが、どんな状

況においても得られ得る。

標的RNA分子の選択

標的RNAは、標的RNAの切断が、RNA分子の存在および発現の結果として、またはそれが細胞の生存性に不可欠であることのいずれかにより生じる病原性のプロセスを阻害するように選択される。例えば、RNAは、細菌病原体またはウイルス

病原体の不可欠なタンパク質成分をコードするmRNAであり得る。RNAは、細菌またはウイルスの感染または複製に不可欠な細菌RNAまたはウイルスRNAであり得、特に、例えば、RNAウイルスの場合はそうである。RNAは、腫瘍癌遺伝子から転写され得るか、または腫瘍特異的タンパク質をコードし得る。RNAは、鎌状赤血球貧血の特徴である欠陥ヘモグロビン分子のような、欠陥タンパク質をコードし得る。

本発明は以下の限定されない実施例を参照することにより、さらに理解される。

実施例1：調節可能なリボザイムを用いるタンパク質生産の阻害

図2Aに示したように、調節可能なリボザイムを上記に示したように構築し、図2に示したように細胞44中で標的RNAタンパク質42をコードする標的RNA40を切断した。調節可能なリボザイム分子45の活性は、タンパク質42との結合に依存するので、リボザイム45はタンパク質42と結合したときだけ活性

である。標的RNA40のレベルが、リガンド活性化リボザイム42および45による切断により低下するので、タンパク質リガンド42の濃度が低下する。調節可能なリボザイム分子45が全部占めている場合よりも低い濃度に、タンパク質42の濃度が低下するとき、リボザイム切断速度は低下し始める。

調節可能なリボザイム-リガンド親和性の相違について選択することにより、標的RNAのリボザイム仲介破壊を調節する適切なレベルは、どのような状況下においても達成され得る。

図2Bは、リボザイム45が、外因的に供給される共薬剤リガンド43に結合し、次いで細胞44中で標的40を切断する場合のみ活性である状況を示す。

実施例2：チバクロンブルー染料によるHBV基質切断の阻害

図3Aは、調節可能なリボザイムの配列（138ヌクレオチド）を示す。この配列は、B型肝炎ウイルス（HBV）表面抗原（HBsAg）mRNA（配列番号1）に対するハンマーヘッドリボザイム（39nt）の配列の近隣のチバクロンブルー（CB）染料結合配列（99nt）（EllingtonおよびSzostak, 1990）を含むDNAオリゴヌクレオチドを合成することにより構築した。このオリゴヌクレオチドをT7 RNAポリメラ

ーゼを用いてインビトロで転写することにより、CB結合およびハンマーヘッド配列に対応する単一のRNA分子が得られた。

この分子を、CBの非存在下および存在下で、HBsAgメッセージの切断における活性について試験した。図3Bは、 $1 \times TB$

E中で800ボルトで行った4%ポリアクリルアミド電気泳動ゲルを示す。リボザイムに対する基質（HBsAg mRNAのプレ-S2/S領域に対応する837ヌクレオチドRNA）の比は、1:4であった。レーン1~3、4~6、7~9、および10~12は、それぞれ0.5、1、2.5、および4時間のリボザイムと基質との反応時間を表す。レーン1、4、7、および10は、リボザイム、基質、およびEDTAを含むコントロール反応である。レーン2、5、8、および11は、 Mg^{++} の存在下でのリボザイムと基質との反応であり、時間の経過につれて切断が増加したことを表す。レーン3、6、9、および12は、 Mg^{++} およびチバクロンブルーの存在下でのリボザイムと基質との反応である。リガンドはリボザイム配列に結合されていた。レーン9および12は、リガンドなしでの反応、つまりレーン8および11それぞれと比べた、リガンドの存在下での切断の阻害を明らかに表す。

実施例3：転写または翻訳誘導性ベクター

系の有用性は、直接的な医学的適用を超えて、さらに基本的なリサーチへの適用にまで広げられ得る。図4A~Dは、遺伝子の発現を調節するためにこの技術をさらに幾通りか用いることを示す模式図である。

第1のスキームでは、図4Aに示すように、内因性遺伝子に対して、またはプラスミドのトランスフェクションまたはウイルスでの感染により細胞中に続いて導入される遺伝子に

対して、または、図4Bにも示したように、リボザイムおよび調節しようとする発現と同じベクター上に存在する遺伝子に対して、共薬剤応答リボザイムを選択し得る。例えば、B型肝炎ウイルス表面抗原（HBsAg）mRNA 54に対するリボザイム52をコードする合成遺伝子50（これは、細胞によって容易に取り上げられる共薬剤56の存在下でのみ活性であり、そしてHBsAgメッセージを切断するように選

扱われている)は、一時的または安定な発現プラスミド58上で、HBsAg産生細胞に導入され得る。HBsAgメッセージおよびタンパク質の定常レベルは、スロットブロッキングおよびELISAのそれぞれにより容易に定量され得る。共薬剤56を培地に添加する際に、細胞はそれがリボザイム52に作用するように取り上げるべきであり、HBsAgメッセージ54を切断し、RNAおよびタンパク質レベルを減少させる。培地から共薬剤56を除去する際に、リボザイムを不活性立体配座に戻し、そして転写物およびタンパク質レベルを、それらの定常レベルまで上げなければならない。

図4Bに示す系において、一時的なまたは安定な発現ベクター60を構築する。ここで、ある配列66に対する調節可能なリボザイム64の遺伝子62を、構成性プロモーター68の制御下に置く。同じプラスミド60上で同一のプロモーター68が、マルチクローニング部位72にクローニングされるあらゆる遺伝子70の発現を制御する。プロモーター68の次は配列74であり、次にマルチクローニング部位72、次に再び配列74、次にマルチクローニング部位72、次に再び配列74、次にポリアデニ

ル化シグナル76が続く。マルチクローニング部位72中でクローニングされるいずれもの遺伝子70を転写して、mRNA78を得る。このmRNAは、5'末端に配列74をAUG開始部位70aに向かって上流に有し、遺伝子70のコーディング領域が続き、そして終止コドン70bとポリ(A)末尾76との間の3'末端に配列74を有する。調節可能なリボザイム62が共薬剤78の存在下で不活性であれば、この共薬剤78の非存在下で、ベクター60を細胞中に導入することにより、遺伝子70 mRNAに対する活性リボザイムおよび遺伝子70の両方を転写する。しかし、遺伝子70のメッセージは、リボザイム62により74部位の5'および3'の両方を切断されて、断片74aおよび74bが得られ、そして両末端からのエキソヌクレオチド分解(exonucleolytic)攻撃に利用可能である;すなわち、遺伝子70は不活性化される。共薬剤78を培地に添加し、そして細胞に入れるとき、リボザイム62は不活性になり、そして遺伝子70のmRNAは、正常に転写されそして翻訳される。従って、遺伝子70の発現は、リボザイムの誘導性制御下で行われる。

図4Cに模式図的に示した別の系は、自己調節発現系の構築を含み、ここで、図4Bのリボザイム62は、遺伝子70の遺伝子産物80により調節される。例えば、リボザイム62は、遺伝子70のタンパク質産物80の存在下でのみ活性であり、この点において、配列74で切断し、そしてメッセージ70を不活性化し、タンパク質80の発現の減少を招く。タンパク質レベルが下がるので、リボザイムはより不活性になり、遺伝子70メ

ッセージレベルは増加する。

転写開始時にランダム配列を添加することにより、翻訳的に活性であるかまたは不活性であるmRNAをリガンドの結合により選択し得る。共薬剤は、メッセージの5'末端で、構築物の形成の促進または阻害のいずれかを行うので、多くの翻訳要素のいずれかの転写物への接近可能性を妨げることにより、またはリボゾームへの結合を妨げることにより、翻訳をブロックする。図4Dは、調節可能なリボザイム82リーダー配列84が、共薬剤86の非存在下で、mRNA70の翻訳能力を妨げること示す。しかし、共薬剤86が存在するとき、共薬剤86がリーダー配列84に結合し、この阻害を減じ、翻訳が行われ得る。この構築物は、その転写とは関係なくメッセージの翻訳を誘導し得、遺伝子産物88が得られ得る。

改変および変形は、上述の詳細な説明から当業者に明らかである。このような改変および変形は、添付の請求の範囲内にあるように意図されている。

配列表

(1)一般的情報:

- (i)出願人: ラボラトリーズ, インコーポレイテッド, イノバー
(ii)発明の名称: 調節可能な核酸治療およびそれらの使用方法

(iii)配列数: 1

(iv)関連住所:

- (A)住所人: パトレア エル. パブスト
(B)番地: スイート 2800, ピーチツリー ストリート 1100
(C)市: アトランタ
(D)州: ジョージア
(E)国: アメリカ合衆国
(F)郵便番号: 30309-4530

(v)コンピューター読み出し形態:

- (A)媒体型: フロッピーディスク
(B)コンピューター: IBM PC 互換用
(C)操作システム: PC-DOS/MS-DOS
(D)ソフトウェア: パテントインリソース #1.0、バージョン #1.25

(vi)現在の出願データ:

(A)出願番号:

(B)出願日:

(C)分類:

(vii)先願の出願データ:

(A)出願番号: US 07/987,465

(B)出願日: 1992年12月4日

(viii)代理人／事務所情報：

(A)氏名：パプスト, パトレア エル.

(B)登録番号：31.284

(C)照会／記録番号：IL1107

(ix)電話回線情報：

(A)電話：(404)-815-6508

(B)テレファックス：(404)-815-6555

(2)配列番号1の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：138塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：RNA (ゲノム)

(iii)ハイボセティカル配列：NO

(iv)アンチセンス：NO

(vi)起源

(A)生物名：合成

(ix)配列の特徴

(A)特徴を表す記号：misc_feature

(B)存在位置：1..99

(D)他の情報：／機能＝「チバクロンブルー結合配列」

(ix)配列の特徴

(A)特徴を表す記号：misc_feature

(B)存在位置：100..138

(D)他の情報：／機能＝「ハンマーヘッドリボザイム配列」

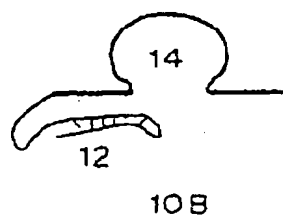
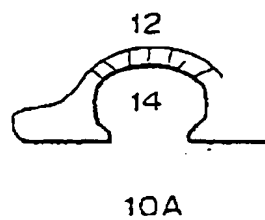
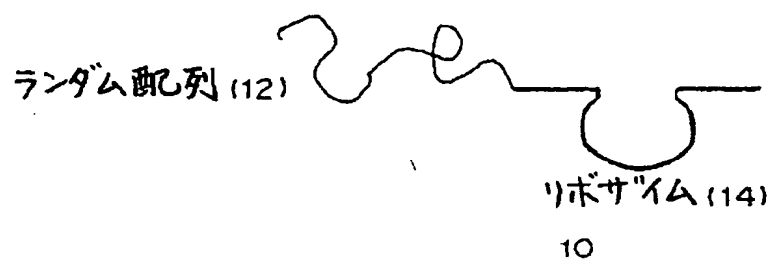
(xi)配列：配列番号：1：

(24)

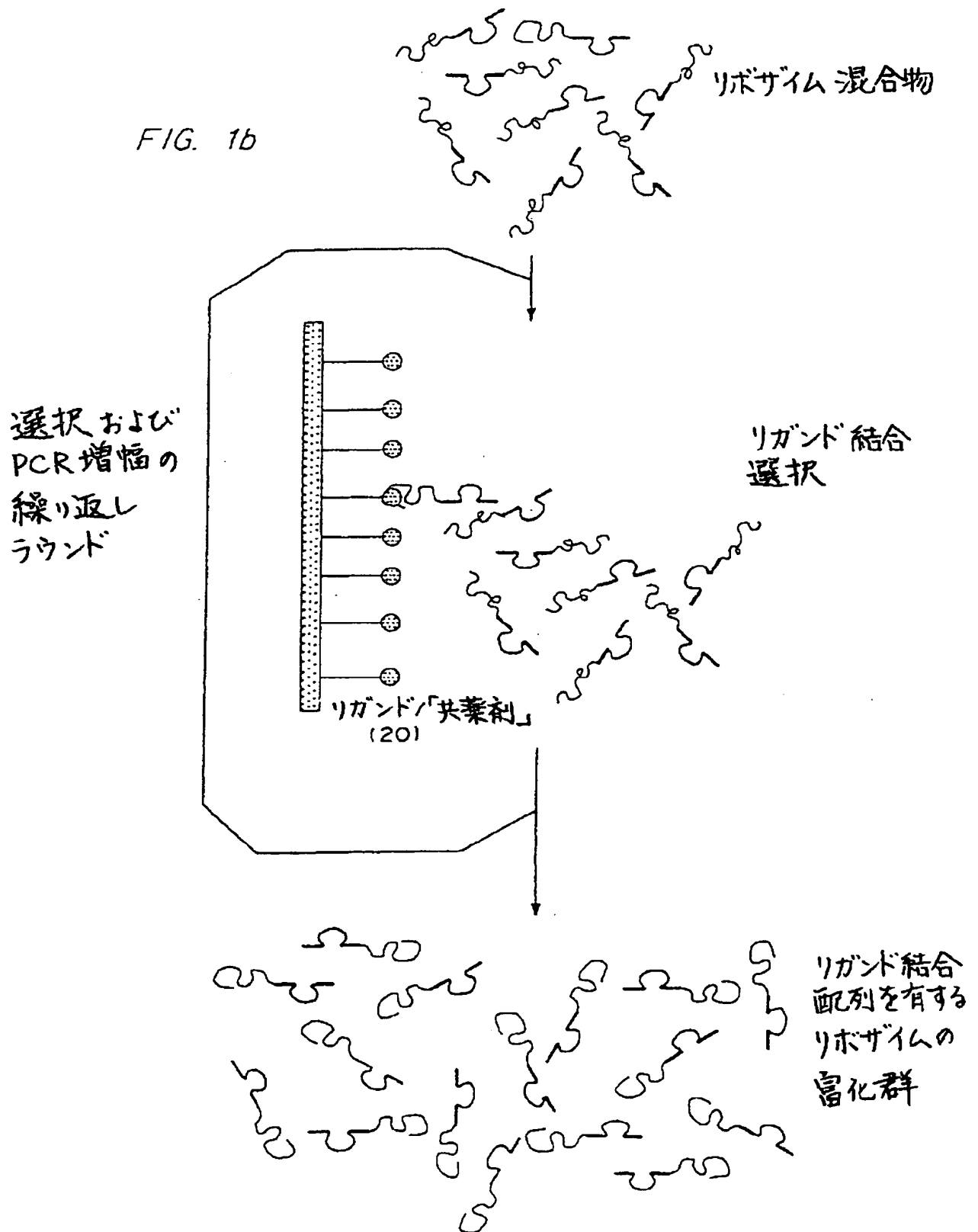
GAGAGGCCCA	CCUGGCCUUUG	AACUCUAUGU	UAUUGGGUGG	GGGAAACUUA	AGAAAACUAC	60
CACCCUUCAA	CCAUUACCGC	CCUUCAGCCU	GCCAGCGCCC	GAGUCUACUG	AUGAGUCCGU	120
GAGGACGAAA	CUCUGCGG					138

【図1a】

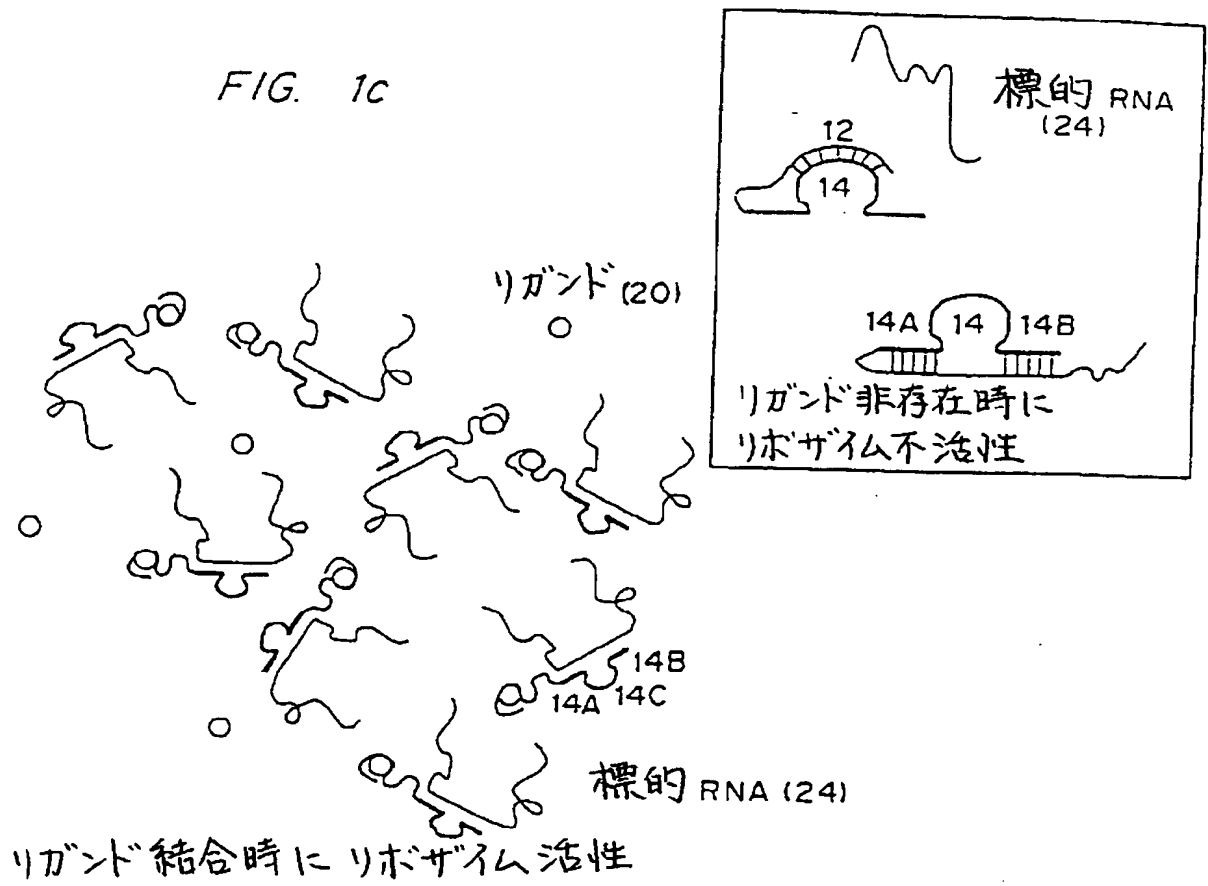
FIG. 1a



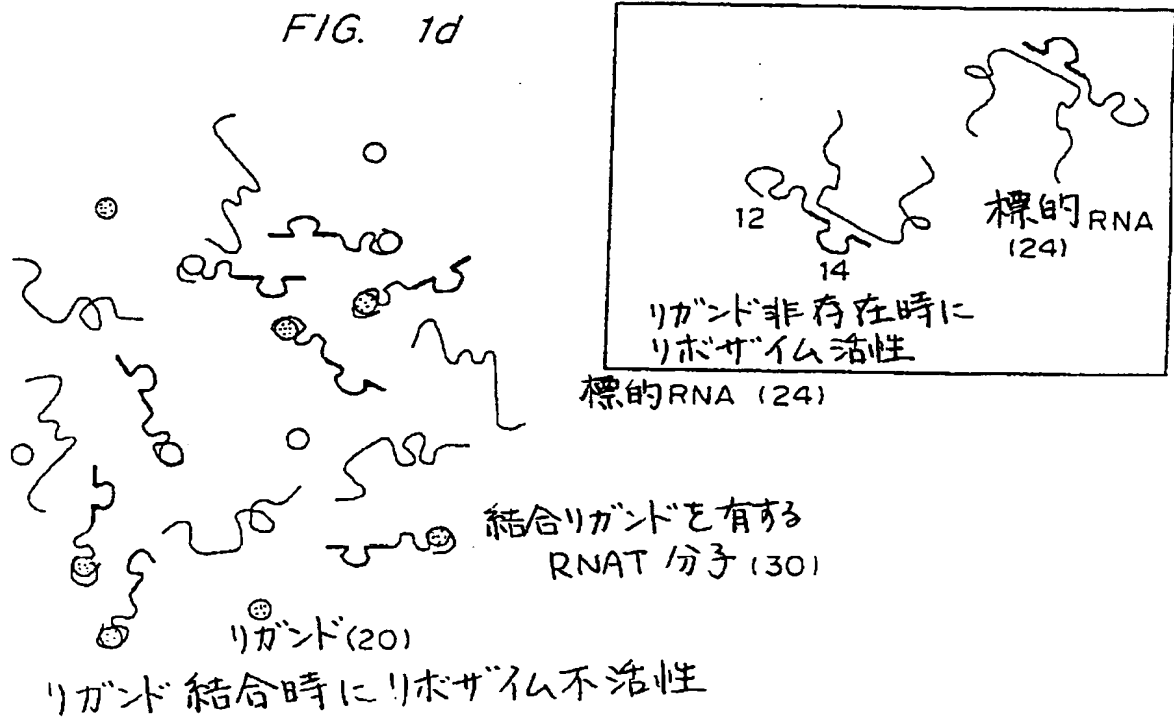
【図1b】



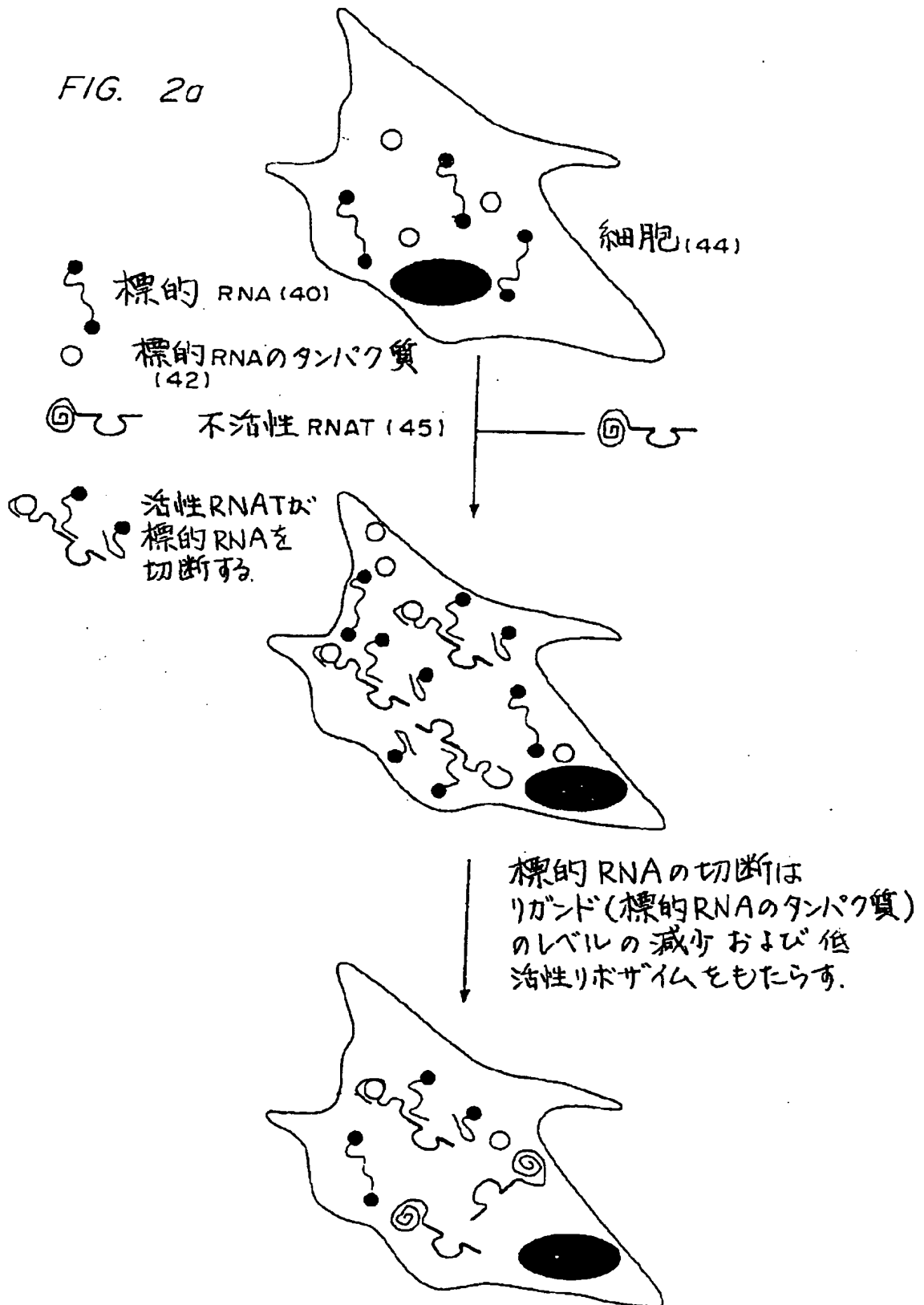
【図1c】



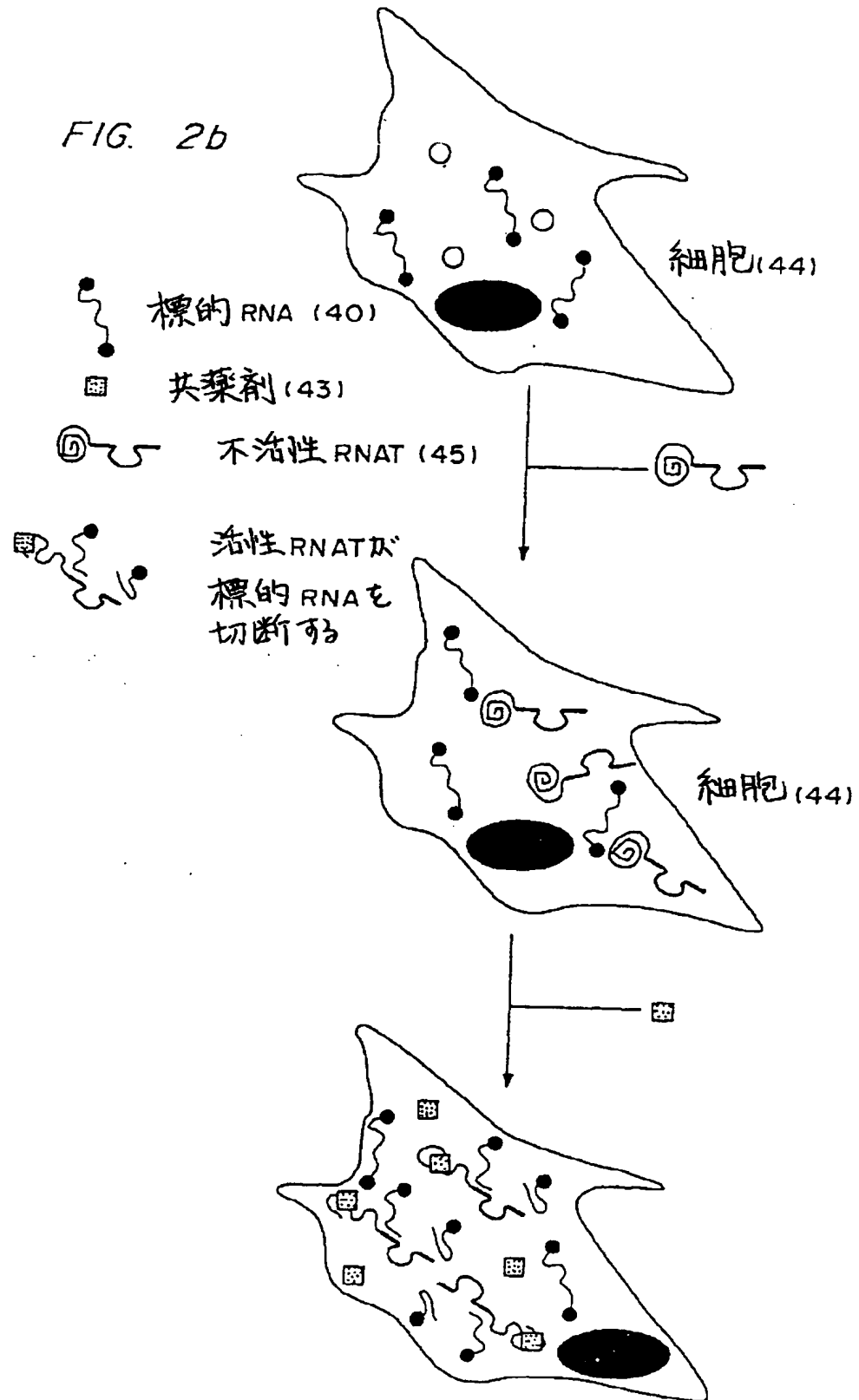
【図1 d】



【図2a】



【图 2 b】



【図3a】

FIG. 3a

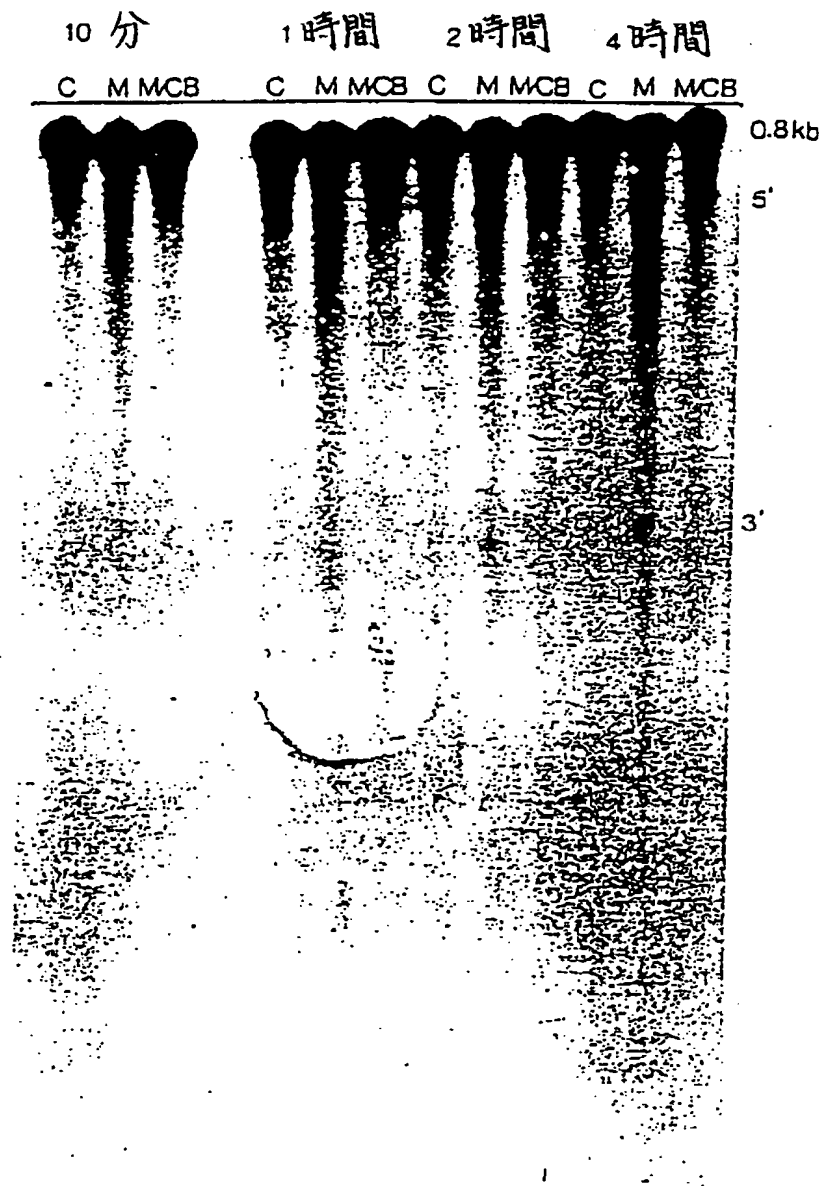
B型肝炎ウイルスRNAに対する
調節可能なリボサーム

チドクロンブルー 結合配列 (太字)

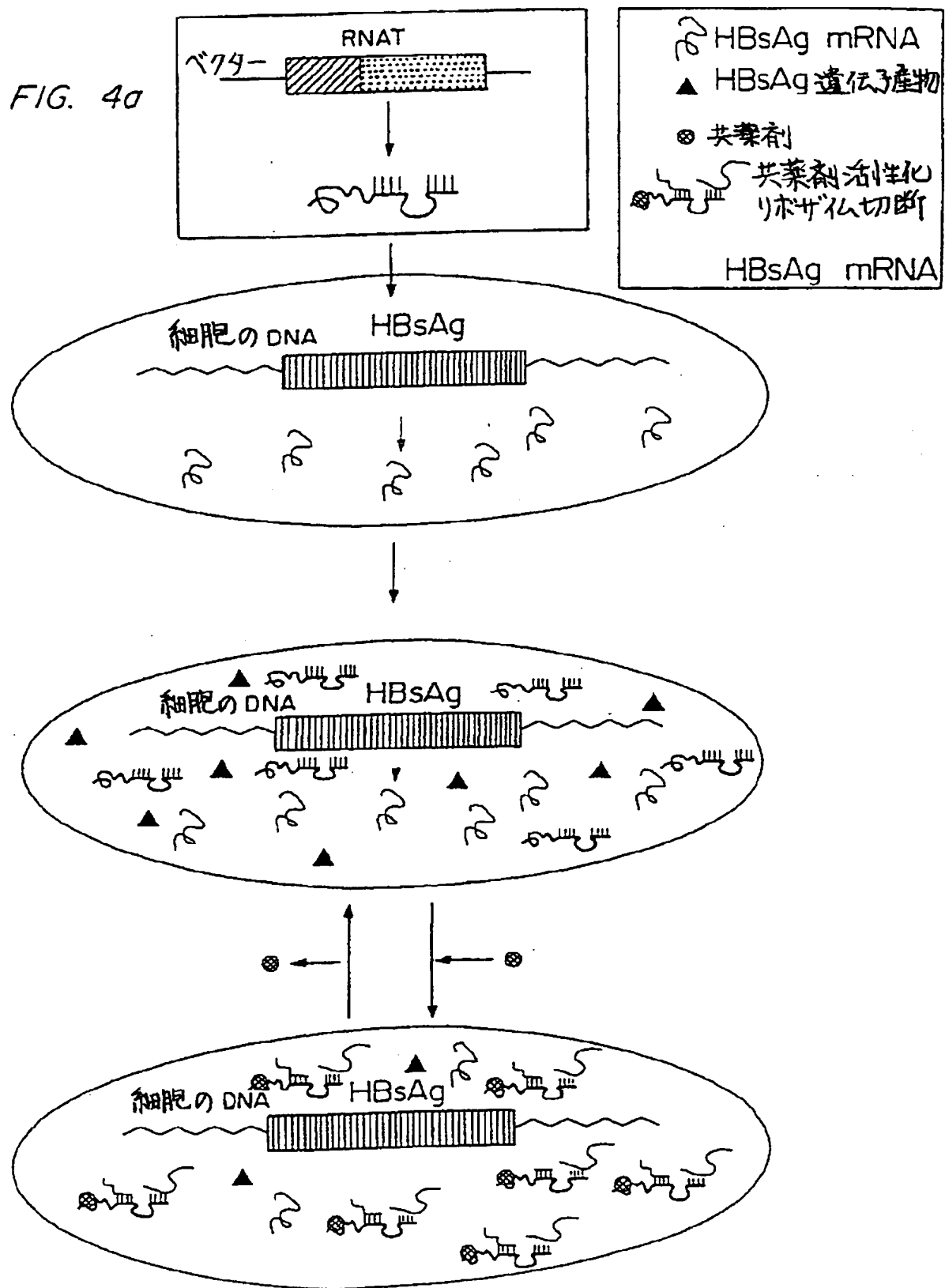
(5')GAGAAGCCCACCUGGCCUUUGAACUCUAUGUUUUUGGGUGGGGGAAA
CUUAAGAAAACUACCACCCUUGAACCAUUACGGCCCUUCAGCCUGCCAG
CGCCCGAGUCUACUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAACUCUGCGG(3')

ハンマーヘッド リボサーム配列 (下線も引いた部分7碱)

【図3B】

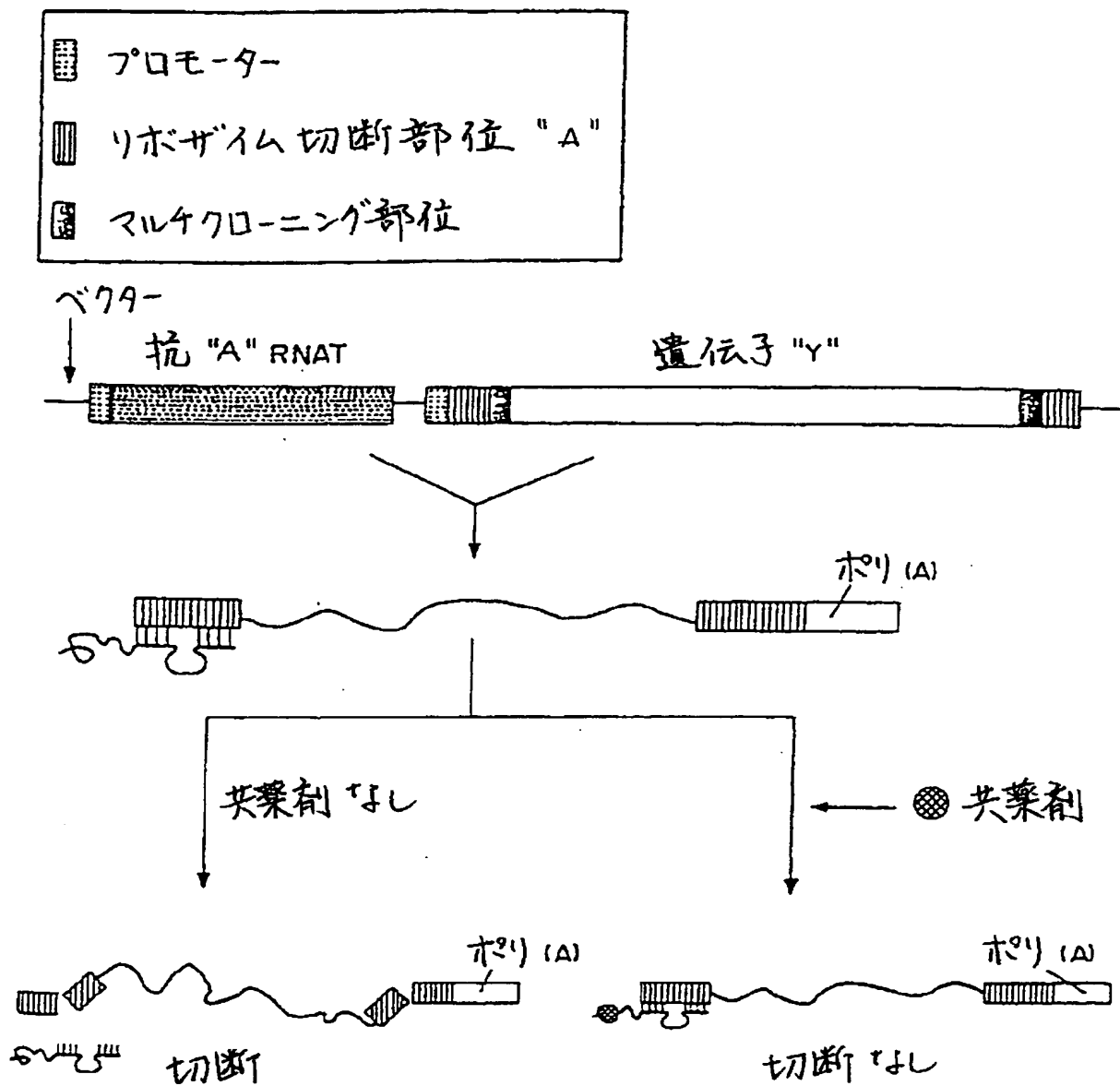


【図4a】



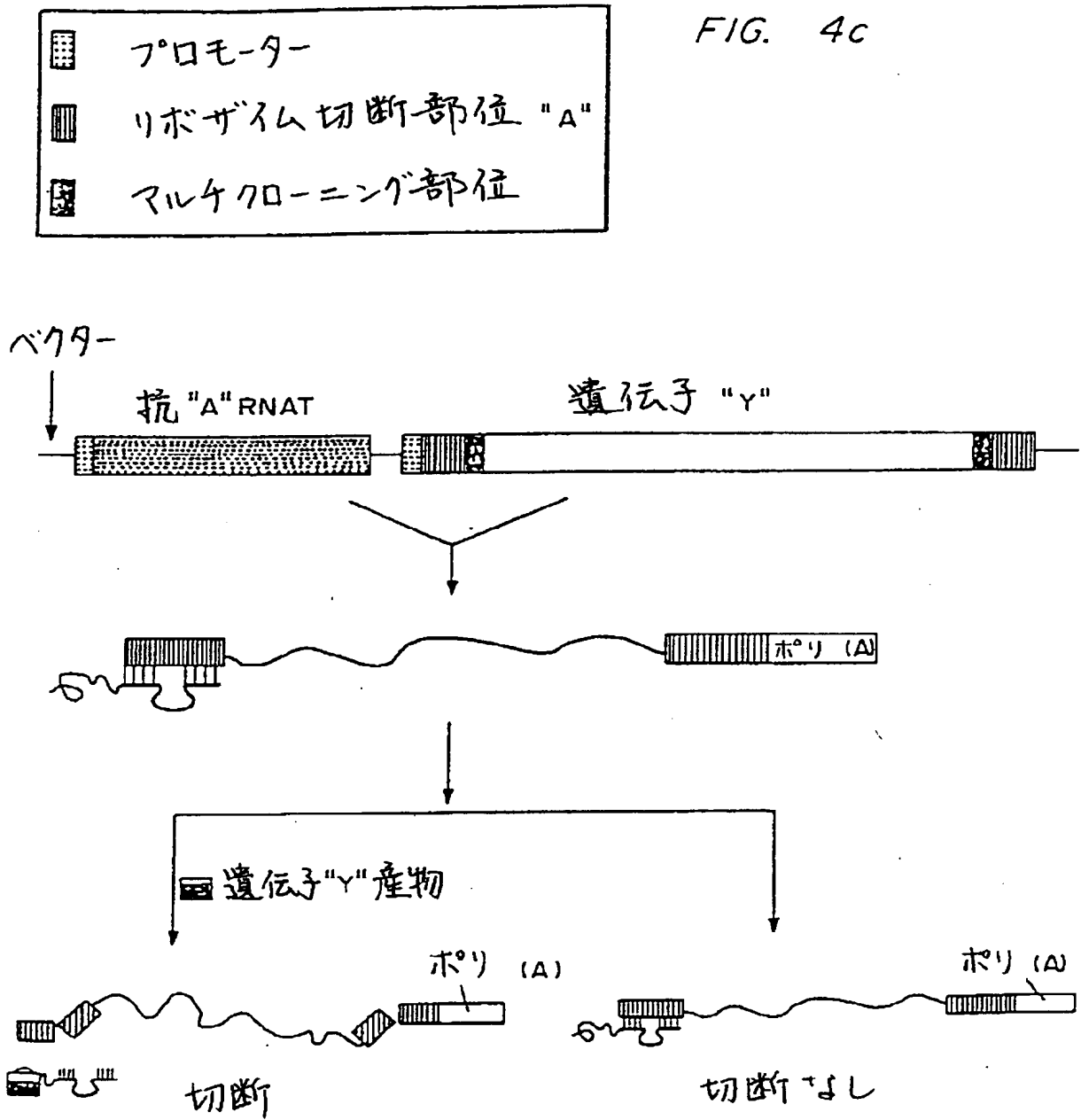
【図4b】

FIG. 4b



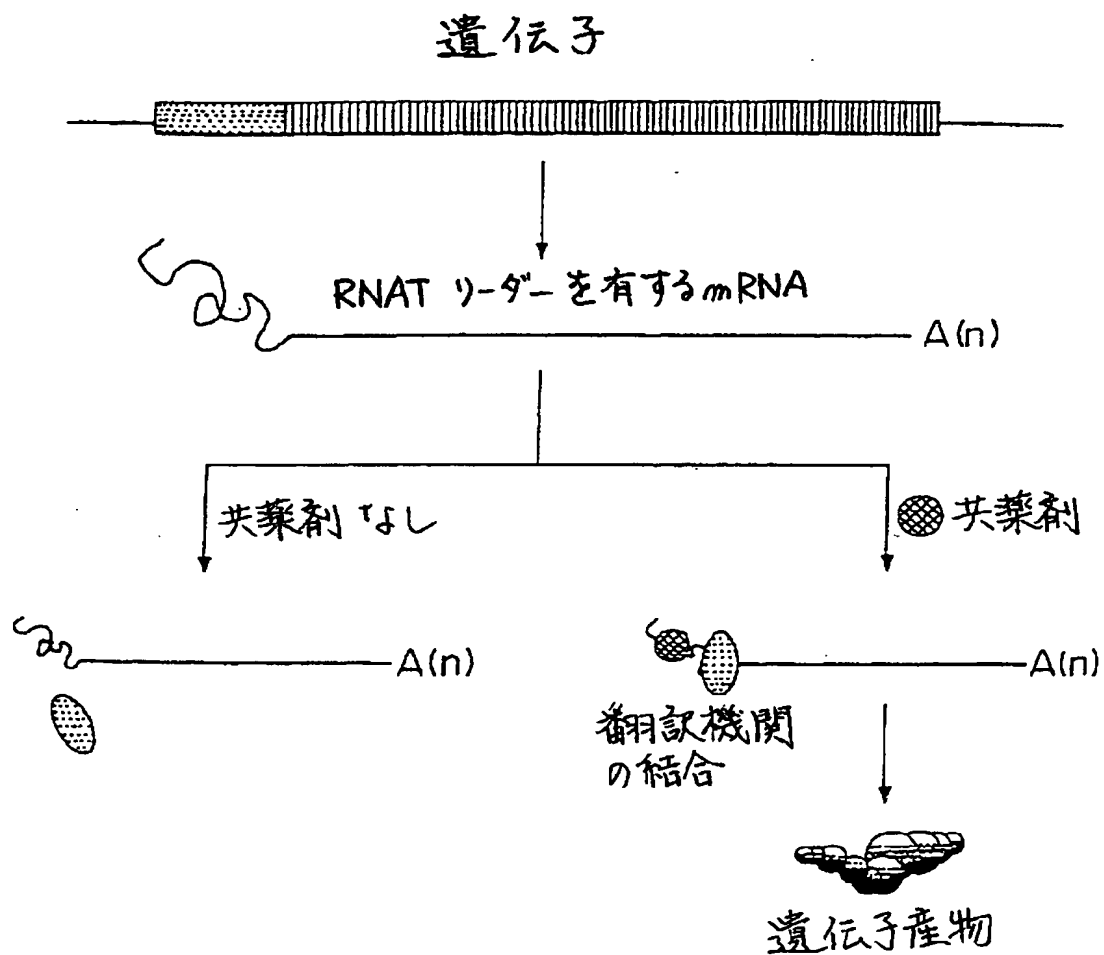
【図4c】

FIG. 4c



【図4d】

FIG. 4d



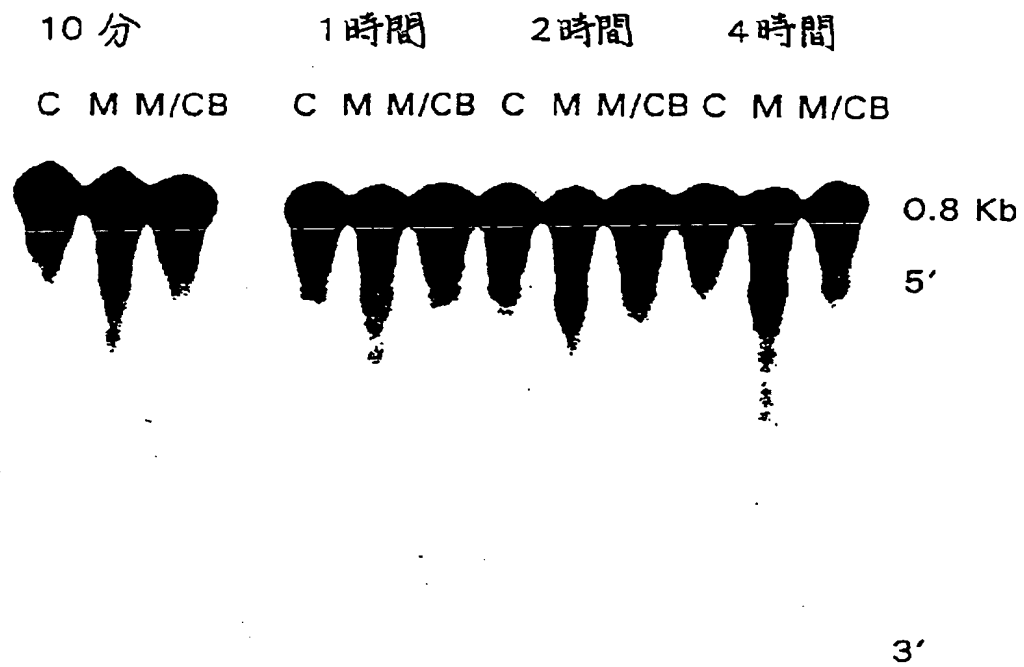
【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1994年11月23日

【補正内容】

【図3B】

FIG. 3B



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/11783

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(5) : C12N 9/10, 9/12, 15/00; C12P 19/34 US CL : 435/6, 91.31, 172.1; 536/23.1, 23.2, 24.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 91.31, 172.1; 536/23.1, 23.2, 24.5 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, BIOSIS, MEDLINE, CAS, Biotech. Abstr. Search terms: Ribozyme?, Ligand?, Ligand-Binding		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Angew. Chem. Int. Ed. Engl., Vol. 31, No. 8, issued 1992, Famulok et al., "In vitro selection of specific ligand-binding nucleic acids", pages 979-988, provided as BIOSIS abstract No. 95000513, see entire abstract.	1-24
Y	US,A, 4,987,071 (Cech et al.) 22 January 1991, see entire document.	1-24
Y	Eds. Block et al., "Innovations in Antiviral Development and the Detection of Virus Infection", published 1992 by "Plenum Press, (N.Y.), pages 95-109, see entire document.	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance "E" earlier documents published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 JANUARY 1994		Date of mailing of the international search report FEB 28 1994
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. NOT APPLICABLE		Authorized officer JOHN L. LEGUYADER <i>D. Kuyze for</i> Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/11783

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Science, Volume 240, issued 24 June 1988, Yarus, "A specific amino acid binding site composed of RNA", pages 1751-1758, see entire document.	1-24
Y	Biochemistry, Volume 28, issued 1989, Yarus, "Specificity of arginine binding by the <u>Tetrahymena</u> intron," pages 980-988, see entire document.	1-24

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
// A 6 1 K 48/00	A D U	8314-4C	
(72) 発明者 シー, アンディ			
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021,			
ニューヨーク, イースト 63アールディー			
ストリート 504			
(72) 発明者 ボックマン, ジェフリー エム.			
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10003,			
ニューヨーク, アパートメント 4 ビー,			
フィフス アベニュー 41			